



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad** Zaragoza

**GEMM**  
Group of Structural Mechanics  
and Material Modelling



**instituto de investigación  
en ingeniería de Aragón**  
Universidad de Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

## Desarrollo de sistemas microfluídicos biomiméticos aplicados a la investigación tumoral

Autor:

**Pablo Sánchez Álvarez**

Directores:

Ignacio Ochoa Garrido  
Jose M<sup>a</sup> Ayuso

Ponente:

Raquel Moreno-Loshuertos

Lugar de realización:

Grupo GEMM  
Departamento de Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras  
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)  
Edificio I+D+i. Campus Rio Ebro

Grado en BIOTECNOLOGÍA  
Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza  
Septiembre 2015

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN AL GLIOBLASTOMA</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>6</b>
3.1 <i>Diseño y fabricación del chip</i>	6
3.2 <i>Cultivo rutinario</i>	7
3.3 <i>Formación de esferoides</i>	7
3.4 <i>Preparación del cultivo 3D</i>	8
3.5 <i>Cultivo a distintas densidades en chip</i>	8
3.6 <i>Co-cultivo en chip</i>	8
3.7 <i>Tinción de hipoxia</i>	8
3.8 <i>Ensayo del fármaco GM6001</i>	9
3.9 <i>Ensayo de toxicidad de la Temozolodamida (TMZ)</i>	9
3.10 <i>Ensayo del fármaco Tirapazamina (TPZ)</i>	9
3.11 <i>Tinción de viabilidad</i>	9
3.12 <i>Microscopía y análisis de imagen</i>	9
3.13 <i>Análisis estadístico</i>	9
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>10</b>
4.1 <i>Cultivo en el interior del dispositivo microfluídico</i>	10
4.2 <i>Cultivo a distintas densidades en chip</i>	11
4.3 <i>Co-cultivo en chip</i>	11
4.4 <i>Tinción de hipoxia</i>	12
4.5 <i>Ensayo del fármaco GM6001</i>	13
4.6 <i>Ensayo de toxicidad de la Temozolodamida (TMZ)</i>	14
4.7 <i>Ensayo del fármaco Tirapazamina (TPZ)</i>	16
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
<b>7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>22</b>

**RESUMEN:**

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral más común, con un crecimiento muy agresivo y una prognosis dramática. El GBM se caracteriza por la presencia de un núcleo necrótico rodeado por una pseudoempalizada de células tumorales migratorias. Los gradientes de nutrientes y oxígeno, así como la presencia de vasos sanguíneos adyacentes al tumor componen un microentorno que parece desempeñar un rol fundamental en el crecimiento fuertemente invasivo de este tumor. La recreación de este microentorno puede suponer un gran avance en el estudio del GBM, ya que permitiría la investigación en un entorno y condiciones mucho más fieles a las fisiológicas. Las técnicas de cultivo tradicionales así como los modelos animales no nos permiten mimetizar este microentorno y parte de los esfuerzos de la investigación biomédica han apuntado hacia la búsqueda de nuevas alternativas, destacando entre ellas la tecnología de la microfluídica. En el grupo GEMM se han diseñado y fabricado dispositivos microfluídicos con el objetivo de crear un modelo *in vitro* que permita recrear esta estructura compleja en la que se desarrolla el GBM. En el presente trabajo, se han realizado con éxito ensayos para la validación de este modelo *in vitro* entre los que destacan la realización de cultivos a altas densidades en un entorno 3D o el co-cultivo de células tumorales. De forma paralela, se ha llevado a cabo una búsqueda de nuevos fármacos para la mejora del tratamiento del GBM utilizando este dispositivo microfluídico.

**ABSTRACT:**

*Glioblastoma (GBM) is the most common brain tumor, with a very aggressive growth and poor prognosis. GBM is characterized by the presence of a necrotic loci surrounded by a pseudoempalisade of migratory tumor cells. Nutrient and oxygen gradients, as well as the presence of blood vessels adjacent to the tumor produce a microenvironment which appears to play a key role in this accelerated and invasive tumor growth. The recreation of this microenvironment could be a great step forward to the GBM study, as it could allow researching in an environment and conditions closer to the physiological ones. Traditional culture techniques and the animal models can't imitate this microenvironment and part of the biomedical research's efforts have aimed to discover new alternatives, like the microfluidic technology. The GEMM group has designed and produced microfluidic devices in order to create an in vitro model which could recreate this complex structure where the GBM develops. In the present project, successful trials to validate this in vitro model have been done like as high density cultures in a 3D environment or tumor cell's co-cultures. In addition to this, we have been searching for new drugs using this microfluidic device in order to improve the GBM treatment.*

## 1. INTRODUCCIÓN AL GLIOBLASTOMA:

El glioblastoma (GBM), también denominado astrocitoma de grado IV, es el tumor cerebral primario más común y de mayor mortalidad, con una prognosis realmente dramática<sup>1</sup>. Si no se recibe tratamiento médico la esperanza de vida es menor a cuatro meses. Incluso en pacientes que reciben el tratamiento médico convencional, basado en la resección quirúrgica combinada con radioterapia y quimioterapia (temozolomida), la tasa de supervivencia media apenas alcanza el año de vida<sup>2</sup>. Como ya hemos comentado previamente, el GBM forma parte de los tumores cerebrales denominados astrocitomas. Estos tumores surgen a partir de astrocitos, células gliales estrelladas que componen el tejido del cerebro. Brevemente, las células gliales forman parte del sistema nervioso y tienen función de soporte neuronal. A pesar de ser células no eléctricamente excitables, están implicadas en la transmisión y plasticidad sináptica. Los astrocitomas se clasifican en grados del I al IV, según el estado de anormalidad que presentan las células. Los de bajo grado están más localizados y crecen de forma más lenta, mientras que los de mayor grado se caracterizan por una expansión y crecimiento agresivos. La mayoría de astrocitomas presentes en los niños son de bajo grado, mientras que los de mayor grado los encontramos en pacientes adultos. Existen dos tipos de GBMs, primario y secundario. Los GBMs primarios se originan *de novo*, formando los tumores primarios más agresivos y comunes dentro de los astrocitomas de grado IV. Los GBMs secundarios por el contrario, tienen su origen en astrocitomas de menor grado cuya evolución da lugar tumores de grado IV. Sea cual sea su origen, lo que es seguro es que la transición hacia la formación de GBM conduce a una situación clínica fatal.

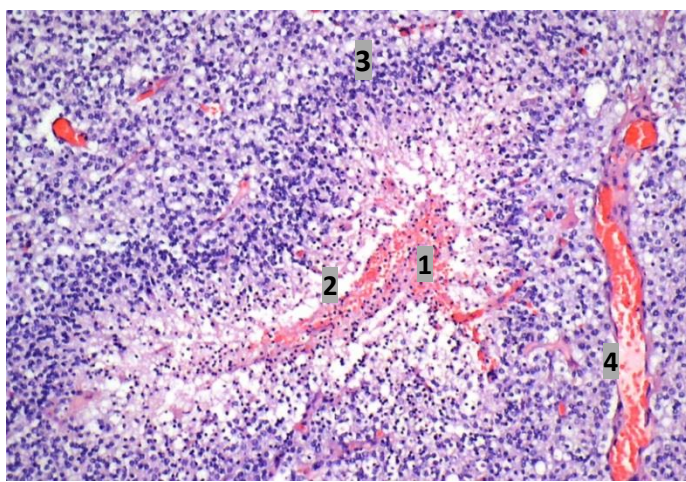
Durante los últimos años, diferentes estudios han logrado arrojar un poco de luz sobre los mecanismos de los que se vale el GBM para desarrollarse, así como sus principales características. En primer lugar el GBM es un tumor que crece de una forma muy rápida, invadiendo todo el tejido circundante; de hecho, la tasa de crecimiento radial puede acelerarse hasta valores cercanos a 10 veces más altos que los astrocitomas de grado I y II<sup>3</sup>. Pero se desconocen las causas de esta expansión tan rápida.

Dentro de las características patológicas que diferencian al GBM de los astrocitomas de menor grado encontramos principalmente la presencia de un núcleo necrótico rodeado por una densa agrupación de células tumorales denominada pseudoempalizada<sup>2</sup>. Ambas estructuras están implicadas en las propiedades de crecimiento acelerado que caracterizan la transición del grado III a IV. Esta muerte celular es fundamental en el desarrollo del GBM, y se produce tanto en forma de apoptosis (muerte celular programada) como por necrosis coagulativa<sup>4</sup>. Esta última causada por la disminución de riego sanguíneo al formarse un coágulo y por tanto disminuir el aporte de oxígeno y nutrientes. Los niveles apoptóticos en GBM son generalmente bajos y apenas presentan correlación con la prognosis<sup>5-6</sup>. Sin embargo, la necrosis coagulativa representa el mayor porcentaje de muerte celular en el GBM. De hecho, la presencia de este núcleo necrótico se ha convertido en el mejor marcador de prognosis para este tumor cerebral<sup>7-9</sup>. Como hemos comentado anteriormente, rodeando a esta zona necrótica encontramos una zona de alta densidad celular, denominada pseudoempalizada. Esta pseudoempalizada se cree que está profundamente implicada en la agresividad del GBM, por lo que descifrar los mecanismos que llevan a su formación sería de enorme utilidad para comprender mejor el desarrollo del tumor y desarrollar nuevos fármacos más eficientes.

Hasta ahora se ha visto que estas células que forman la pseudoempalizada son menos proliferativas que las células del astrocitoma adyacente<sup>4</sup>. Esto descarta la idea previa de que las pseudoempalizadas se originan por una serie de células de rápida división. Por otra parte, estas células de la pseudoempalizada muestran niveles más altos de apoptosis<sup>4</sup> comparados con el resto de células de astrocitoma, lo cual indica que no poseen ventajas para su supervivencia que les permitan acumularse y desarrollarse. De hecho, esta pseudoempalizada está formada por un frente celular migratorio que parece huir de esta zona necrótica central. Dicha hipótesis viene apoyada por una serie de observaciones experimentales: las células de GBM han demostrado poseer una respuesta adaptativa ante la hipoxia, expresando factores

inducibles como HIF-1<sup>10-11</sup> y proteasas extracelulares asociadas con la invasión (MMP-2 o uPAR)<sup>12-13</sup> que les confieren una capacidad migratoria mayor que las células normóxicas. Por tanto, la mejor forma de definir esta pseudoempalizada es como una onda o frente de células hipóxicas con alta capacidad de migración que invaden el tejido circundante en busca de nutrientes.

Por lo tanto, la actual hipótesis sobre el GBM sugiere la oclusión o trombosis de un vaso adyacente al tumor como mecanismo desencadenante de la invasión. Según esta hipótesis, la oclusión del vaso sanguíneo, provocado por la secreción de moléculas procoagulantes<sup>4</sup> por parte del GBM, provocaría una situación de hipoxia alrededor del mismo. Las células tumorales que anteriormente se abastecían del vaso ahora colapsado se verían forzadas a migrar y alejarse de la zona hipóxica. Aquellas células tumorales no migratorias morirían por necrosis y formarían así el núcleo necrótico, rodeado a su vez por la pseudoempalizada migratoria.



**Figura 1:** Corte histológico cerebral de paciente de GBM. Tinción con H&E. 1. Vaso colapsado. 2. Núcleo necrótico alrededor del vaso. 3. Pseudoempalizada de células hipóxicas migratorias. 4. Vaso sanguíneo.

*Imagen referenciada.<sup>14</sup>*

Son muchos los factores y mecanismos que intervienen en el origen y desarrollo del GBM. Esta oclusión de un vaso sanguíneo, generando así hipoxia y falta de nutrientes constituye en conjunto un microentorno específico de vital importancia para el desarrollo del GBM, ya que induce una transición de un fenotipo proliferativo a otro más invasivo. La reproducción de este microentorno asociado al tumor puede suponer un punto de inflexión en el estudio del GBM, ya que nos permitiría estudiar dicho tumor en unas condiciones mucho más similares a las fisiológicas. Sin embargo, las técnicas de cultivo tradicional no nos permiten reproducir fácilmente este microentorno. El cultivo convencional en placas de Petri nos proporciona información valiosa pero no es capaz de generar un entorno 3D dotado de vasos sanguíneos con condiciones de hipoxia localizada. Por otra parte, la utilización de modelos animales no nos permite estudiar de forma aislada los distintos factores implicados en el proceso. Además, suelen ser ensayos más lentos, implican un mayor coste económico y están ligados a serios problemas éticos. Es por ello por lo que los esfuerzos de la investigación biomédica se están encaminando hacia la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan recrear el complejo microentorno tumoral. Entre estas tecnologías destaca la microfluídica, que parece llamada a revolucionar el cultivo *in vitro*.

La microfluídica se caracteriza por el estudio y manipulación de fluidos a escala micrométrica. Con esta tecnología se pueden manipular los fluidos de forma precisa y controlada, utilizando dispositivos de escala micrométrica aplicables a un gran abanico de campos diferentes. A pesar de estar todavía en una etapa temprana de desarrollo, esta tecnología ha demostrado tener un futuro prometedor en la mejora del diagnóstico y la investigación biomédica, proporcionando varias ventajas sobre los cultivos tradicionales. La reducción significativa del volumen de muestra o su adecuación para aplicaciones de cribado de alto rendimiento (high-throughput screening) son algunas de las ventajas que la microfluídica provee al ámbito biomédico. Para comprender mejor por qué la microfluídica presenta estas características y ventajas debemos atender a una serie de conceptos de gran utilidad como el de flujo laminar y la tensión

superficial. El número de Reynolds ( $Re$ ) es un parámetro adimensional que describe la relación entre las fuerzas inerciales y viscosas de un fluido. De forma simplificada, un alto número de  $Re$  provoca que los fluidos presenten perfiles de flujo con trayectorias caóticas que se mezclan con el paso del tiempo (flujo turbulento). Por el contrario, sistemas con bajos números de  $Re$  producen un régimen de flujo laminar donde los perfiles de flujo no se mezclan entre sí y se pueden predecir con facilidad. En los sistemas microfluídicos, el número de  $Re$  se enmarca siempre dentro de los valores de régimen de flujo laminar, lo que permite predecir de forma controlada la dinámica del fluido. Por otro lado, la tensión superficial se define como la tendencia de un fluido para disminuir su energía libre en una superficie mediante la contracción de la interfase superficie-fluido. A escala microscópica, el efecto de esta tensión es dominante con respecto a la fuerza de la gravedad y ha sido aprovechado para múltiples aplicaciones (como el llenado pasivo de microcanales).

A pesar de todas las ventajas comentadas hasta ahora, la microfluídica todavía no ha llegado a consolidarse dentro del ámbito médico y biológico. De hecho, según recientes estudios sólo un 9% de los artículos relacionados con la microfluídica aparecen en revistas de biología y medicina, mientras que más de un 80 % aparecen en revistas relacionadas con la ingeniería<sup>15</sup>. Y es que uno de los principales aspectos que influye decisivamente en el futuro de la microfluídica es el material utilizado para la fabricación de los dispositivos. Encontrar un material biocompatible, con capacidad de moldeo y con un coste aceptable para su producción en masa, no es una tarea fácil. A lo largo de los años, los materiales utilizados para la fabricación de los dispositivos han ido cambiando con el objetivo de constante mejora. En sus comienzos, el material más empleado era el cristal; sin embargo, su fragilidad y poca capacidad de moldeo encarecían los costes de fabricación, lo que impulsó la búsqueda de alternativas más baratas. Posteriormente se utilizó el polidimetilsiloxano (PDMS), un elastómero transparente y permeable al gas. La principal ventaja del PDMS reside en su enorme capacidad de moldeo, pudiendo diseñar y fabricar mediante litografía multitud de dispositivos microfluídicos. De hecho, el PDMS continúa siendo el material más empleado y su utilización ha sido vital para el desarrollo de la microfluídica. Sin embargo, la fabricación de microdispositivos basados en PDMS requiere de complejos equipos y a menudo de sofisticadas instalaciones tales como una sala blanca. Además, se ha comprobado que pequeñas moléculas orgánicas, como pueden ser las hormonas esteroideas, pueden penetrar en el PDMS y quedar así retenidas dentro del propio material<sup>16-17</sup>. Finalmente, está técnica basada en el uso del PDMS no es capaz de producir en masa los microdispositivos<sup>15</sup>, lo que impide su implementación como técnica rutinaria en los laboratorios. Recientemente, la fabricación de dispositivos microfluídicos ha apuntado hacia materiales termoplásticos tales como el poliestireno (PE). En concreto, éste último ha demostrado ser un material más biocompatible que el PDMS como demuestra su constante uso a lo largo de la historia del cultivo celular<sup>18</sup>. Los costes de fabricación en masa resultan mucho menores en comparación con el resto de alternativas comentadas. Además, los microdispositivos basados en PE son cada vez de mayor complejidad y precisión, por lo que tienen un prometedor futuro dentro de la microfluídica.

En la búsqueda de este material y diseño ideal para acercar la microfluídica a los laboratorios de cultivo convencionales, en el grupo GEMM hemos diseñado un microdispositivo de PE para cultivo celular en sistemas 3D. Este microdispositivo de apenas 4 cm de longitud presenta en su diseño una microcámara central comunicada con dos microcanales laterales (en el apartado 2.1 se describe en detalle el diseño del microdispositivo). Por simple pipeteado manual se pueden perfundir los distintos líquidos en el interior del microdispositivo. Mediante este dispositivo se pretenden recrear algunos de los procesos clave implicados en el desarrollo del GBM. Los canales laterales del microdispositivo actuarán a modo de vasos sanguíneos mientras que la microcámara central se usará para alojar el cultivo 3D del GBM. Se formarán gradientes de nutrientes y oxígeno a lo largo de la microcámara, simulando las condiciones de hipoxia y necrosis características del GBM. Finalmente se ensayarán diferentes fármacos dirigidos contra estos aspectos clave del tumor, en un intento de abrir nuevas oportunidades terapéuticas.

## 2. OBJETIVOS:

El presente proyecto se enmarca dentro de un proyecto más grande cuyo objetivo final es el desarrollo de un modelo *in vitro* de Glioblastoma que biomimetic el entorno fisiológico en el que se desarrolla el tumor. Dicho modelo consiste en un sistema microfluídico que permite co-cultivos estructurados de células tanto tumorales como estromales y vasculares en un entorno 3D. Este modelo nos permitiría observar la migración tumoral inducida por la falta de nutrientes e hipoxia características del glioblastoma.

El objetivo principal del proyecto se centra en la búsqueda de nuevos fármacos para la mejora del tratamiento de los pacientes de GBM, haciendo uso de un dispositivo microfluídico que genera un entorno biomimético. Paralelos a este, se marcaron los siguientes objetivos parciales:

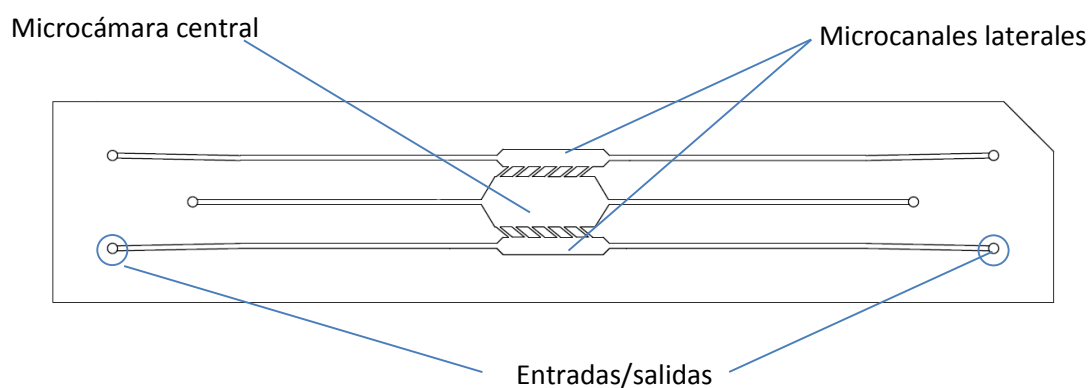
- Desarrollar y generar un modelo *in vitro* de GBM centrado en los microdispositivos.
- Caracterización del microentorno generado para validar su similitud con el estado fisiológico.
- Validación de los resultados con los fármacos de uso habitual en clínica (TMZ).
- Evaluación de la respuesta de un nuevo fármaco (TPZ) efectivo sólo en hipoxia.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Todos los protocolos se encuentran descritos en más detalle en el Anexo 1.

### 3.1. DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL CHIP

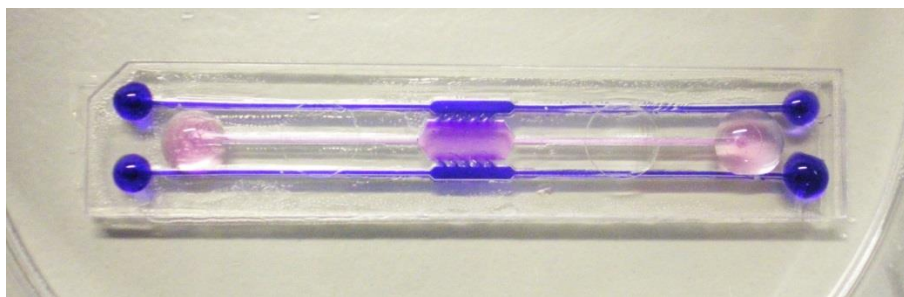
El diseño de los chips incluía una microcámara central flanqueada por dos microcanales laterales. El ancho de la microcámara y de los microcanales era de 2000  $\mu\text{m}$  y 700  $\mu\text{m}$  respectivamente, siendo 250  $\mu\text{m}$  la altura de todos los canales del chip (figura 2). También se integraron entradas (*inlets*) y salidas (*outlets*) para permitir la inserción de líquidos por el interior del chip por pipeteado manual. La microcámara estaba delimitada por una serie de pilares en forma de paralelogramo para permitir el confinamiento del líquido por tensión superficial en la cámara central, dejando los canales laterales vacíos.



**Figura 2:** Plano del chip microfluídico, con sus elementos más importantes.

La fabricación se llevó a cabo mediante moldeado de inyección usando poliestireno como material estructural. Después de una limpieza adecuada con aire a presión, los chips se pegaron a la superficie de una placa de Petri de 60 mm de diámetro utilizando un adhesivo biocompatible para crear una estructura microfluídica funcional (fig 3).





**Figura 3:** Foto del microdispositivo con un gel de colágeno confinado en la cámara central y con los canales laterales perfundidos con un colorante azul. Se puede observar cómo el colorante comienza a difundir por el gel en la zona de los pilares.

### 3.2. CULTIVO RUTINARIO:

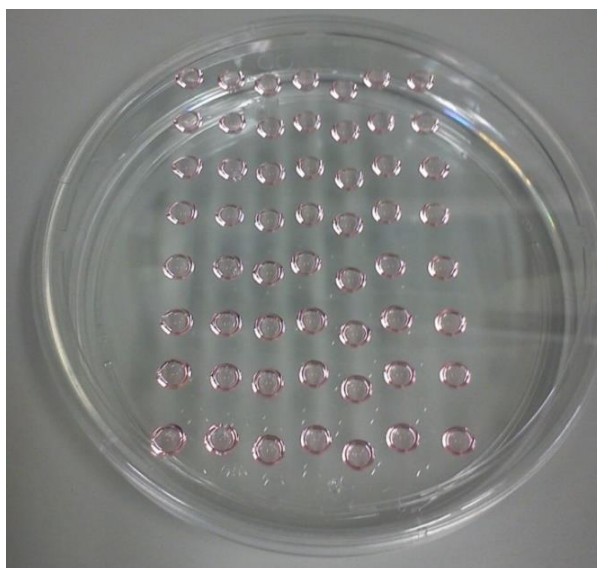
Se utilizó la línea celular U251-MG (Células humanas de Glioblastoma) comprada en la American Type Culture Collection (ATCC). También se emplearon dichas células transfectadas con GFP (U251-MG-GFP) para determinados ensayos. Las células se crecieron en medio DMEM alto en glucosa (Lonza BE12-614F) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Sigma F7524), L-glutamina (Thermo 25030-081) y antibióticos penicilina/estreptomicina (DE 17-602E) (medio denominado DG-10) en un incubador TEB-1000 (EBERS Medical Technology).

### 3.3. FORMACIÓN DE ESFEROIDES:

Se formaron esferoides de U-251-MG mediante el método de gota colgante (*Hanging Drop*) suplementada con metilcelulosa<sup>19</sup>. Este método consistía en sembrar pequeñas gotas de suspensión celular en la tapa de una placa Petri. Al colocar la tapa de la placa sobre la base, estas gotas quedan suspendidas. En estas condiciones la semiesfericidad de las gotas, junto a la gravedad, favorece la concentración de todas las células en el fondo de dicha gota. Para que las células se unan entre sí y formen esferoides es necesario añadir un inductor de la agregación celular, en este caso se ha empleado la metilcelulosa (reactivo Methocel).

Las gotas se dispusieron en la tapa de una placa de Petri, de modo que al darle la vuelta estas quedasen colgando. De esta forma las células se agrupan entre sí formando un sólo esferoide por gota (**Figura 4**).

Se llevó a cabo la formación de 40 esferoides con 1000 células cada uno.



**Figura 4.** Foto de las gotas colocadas en la tapa de la placa de Petri mediante el método de gota colgante. Cada gota de 25  $\mu$ l contenía 1000 células de la línea U251-MG.



### 3.4. PREPARACIÓN DEL CULTIVO 3D:

Para recrear el entorno 3D de los tejidos, se hizo uso de hidrogeles de colágeno. En concreto se utilizó colágeno tipo I de cola de rata (3 mg/ml, Corning 354236). Se empleó NaOH (1N, Sigma 655104) para neutralizar el pH ácido de la suspensión de colágeno y medio DMEM 5x (Sigma D5523) para ajustar la fuerza iónica.

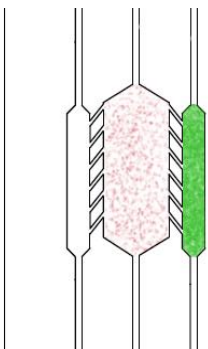
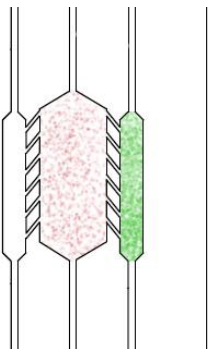



### 3.5. CULTIVO A DISTINTAS DENSIDADES EN CHIP

Para el cultivo de células U251-MG en chips microfluídicos, se realizaba el confinamiento del hidrogel con las células en la cámara central mediante el protocolo detallado en el Anexo 1.

Aunque la cámara central y los canales laterales se encuentran completamente conectados, los pilares que flanquean esta cámara central hacen que el hidrogel se quede confinado en dicha cámara debido a la tensión superficial.

### 3.6. CO-CULTIVO EN CHIP:

Con este ensayo se pretendía generar un co-cultivo estructurado dentro del chip que permita separar poblaciones celulares diferentes en la cámara y en los canales laterales. En la cámara central del chip se perfundía el hidrogel de colágeno junto con las células para, tras su polimerización, perfundir en uno de los canales laterales otro hidrogel con un cultivo a mayor densidad celular. Las densidades estudiadas fueron las siguientes:

Condición A	Condición B
	
 30 millones/ml	 20 millones/ml
En las 3 condiciones, la densidad de la cámara central era de 10 millones/ml 	

Para poder visualizar si había algún tipo de migración de un cultivo hacia otro, las células se marcaron en distintos colores haciendo uso de una tinción celular comercial denominada Vybrant® (Life technologies, V22889). Dicha tinción se basa en el empleo de lípidos marcados fluorescentemente en distintos colores. Estos lípidos se insertan en la membrana celular y las células quedan así marcadas. En concreto se marcaron en color rojo los cultivos de menor densidad y en verde los de mayor densidad. Esta tinción se aplicaba a las células tras la tripsinización, cuando se encuentran en suspensión.

### 3.7. TINCIÓN DE HIPOXIA:

Para evaluar el perfil de oxígeno se llevó a cabo una tinción de hipoxia sobre células U251-MG cultivadas en el interior de la cámara central del chip, a una densidad de 40 millones/ml. El reactivo utilizado (Life

technologies H10498) es un compuesto basado en iridio que se vuelve fluorescente a medida que la presión del oxígeno disminuye.

Cabe destacar que el porcentaje de DMSO tanto en el gel como en el medio de cultivo era del 1%, por lo que esta tinción puede presentar un efecto tóxico sobre las células.

### 3.8. ENSAYO DEL FÁRMACO GM6001

En este ensayo se quiso estudiar el efecto de un inhibidor de las metaloproteasas de membrana (GM6001) sobre la capacidad invasiva de las U251-MG. Estas enzimas se encargan de degradar la matriz extracelular y permiten a la célula moverse a través de ella. Se estudiaron tres concentraciones distintas del inhibidor GM6001 (0'5, 5 y 50  $\mu$ M) y un control sin inhibidor. Cada gel tenía un volumen de 100  $\mu$ l y la polimerización de los mismos se realizó en una placa de 96 pocillos.

### 3.9. ENSAYO DE TOXIDIDAD DE LA TEMOZOLODAMIDA (TMZ):

Se estudió el efecto tóxico del fármaco Temozolodamida sobre el crecimiento y la viabilidad de células U251-MG. Este estudio se realizó sobre cultivos 2D en placa multipocillo y en el interior de los microdispositivos. Tras la siembra de las células en las diferentes condiciones, se analizó la viabilidad celular al microscopio confocal. Para determinar la viabilidad se calculó el porcentaje de células viables con respecto al número total.

### 3.10. ENSAYO DEL FÁRMACO TIRAPAZAMINA (TPZ):

En este ensayo se quiso estudiar el efecto del fármaco Tirapazamina, un compuesto que se vuelve tóxico en condiciones de hipoxia, sobre células U251-MG, cultivadas en geles 3D tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. El fármaco se aplicó en a células cultivadas tanto en placas de Petri como en el interior de los chips.

### 3.11. TINCIÓN DE VIABILIDAD:

Para las tinciones de viabilidad realizadas durante algunos de los ensayos, se hizo uso de los reactivos Yoduro de propidio (PI) y calceína. El PI es un compuesto fluorescente en rojo incapaz de atravesar las membranas celulares. Sólo cuando las células mueren y presentan daños en su membrana, el PI entra en las células y se une al DNA marcando a estas células en rojo. La calceína es un compuesto incoloro y permeable a las membranas celulares. Una vez en el interior celular, la calceína es transformada por enzimas celulares en un compuesto fluorescente en verde y es además impermeable, siendo incapaz de abandonar las células. De esta forma las células viables quedan marcadas en verde y las muertas en rojo.

### 3.12. MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN:

Imágenes de microscopía se tomaron empleando un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con un sistema de microscopía confocal modular C1. El análisis de las imágenes se realizó con la ayuda del software Fiji® (<http://fiji.sc/Fiji>). Para cuantificar la migración de los esferoides se midió de forma manual el área ocupada por los mismos en las distintas condiciones experimentales.

### 3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

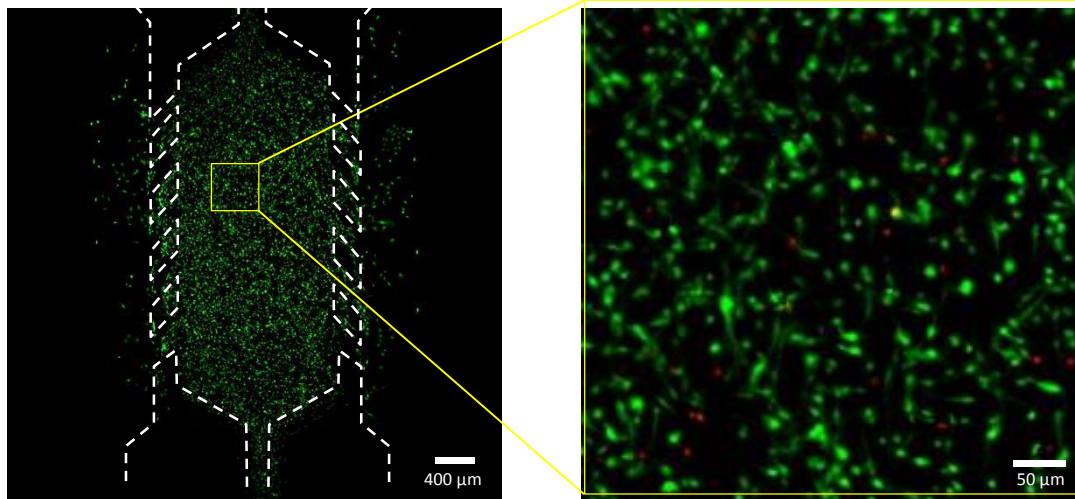
Para el análisis estadístico se asumió que las distintas repeticiones de cada ensayo seguían una distribución normal. A continuación se analizó la diferencia entre distintas condiciones mediante un test de Student con heterogeneidad de varianzas. Se indicó con un asterisco los p valores menores de 0'05.

#### 4. RESULTADOS:

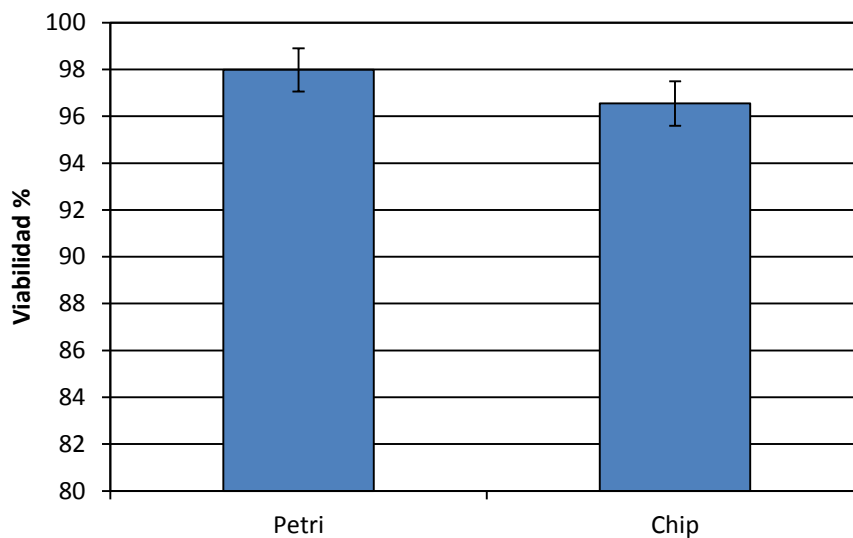
##### 4.1. CULTIVO EN EL INTERIOR DEL DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO:

Los chips de poliestireno desarrollados durante el presente trabajo han demostrado funcionar perfectamente para los objetivos de este proyecto. Su fabricación es rápida y sencilla, además permiten confinar distintos líquidos en las microcámaras y no se han observado problemas de biocompatibilidad (fig 5 y 6).

**FIGURA 5: VIABILIDAD EN EL INTERIOR DE LOS CHIPS**



**Figura 5:** Fotos de microscopía confocal del cultivo celular dentro del microdispositivo; aumento 2x, tinción calceína/PI.

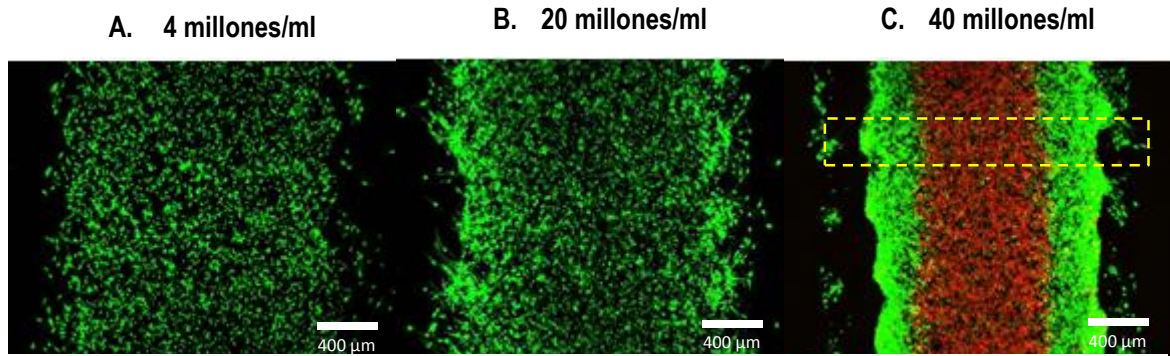


**Figura 6:** Comparación de viabilidades para placas de Petri y los microdispositivos. Tinción de calceína/PI.

Como se puede observar, apenas existe diferencia entre las viabilidades obtenidas en el sistema de cultivo tradicional (placas de Petri) y en el interior de los microdispositivos.

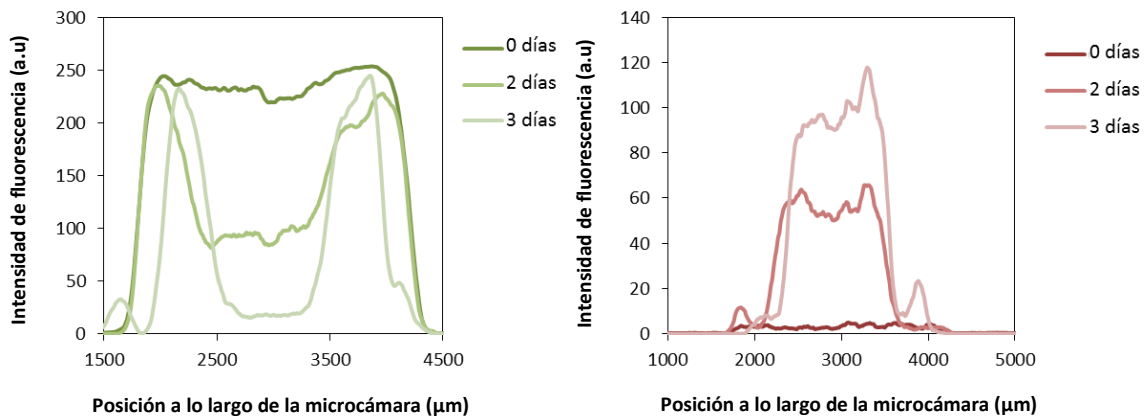
#### 4.2. CULTIVO A DISTINTAS DENSIDADES EN CHIP:

Para estudiar el efecto de la densidad celular sobre la viabilidad celular se llevaron a cabo ensayos a diferentes densidades dentro de los microdispositivos. Tras 3 días en cultivo, en la parte central de los chips comenzó a aparecer una zona necrótica en el centro de la cámara, mientras que las zonas adyacentes a los canales laterales mantenían una viabilidad elevada. Probablemente esto sea debido al alto consumo de nutrientes de las propias células.



**Figura 7:** Fotos de microscopía confocal de los cultivos a densidades de A. 4, B. 20 y C. 40 millones de cél/ml respectivamente a los 3 días, aumento 2x. Tinción de viabilidad calceína/PI.

En la figura 7 (C) se puede observar cómo para las densidades celulares de 4 y 20 millones de células/ml no se intuye una zona necrótica en el centro del chip. Esto puede deberse a que todavía a esas densidades el consumo de oxígeno y de nutrientes no es el suficiente como para provocar la necrosis a las células más alejadas de la fuente de nutrientes. Para la densidad celular mayor, las células más próximas a los canales laterales del chip migran hacia los mismos y se mantienen viables, por el contrario en el centro del chip se observa una intensa zona necrótica. Para esta última condición, se llevó a cabo el histograma de intensidad fluorescente para el área contenida en la sección rectangular amarilla (fig 8).



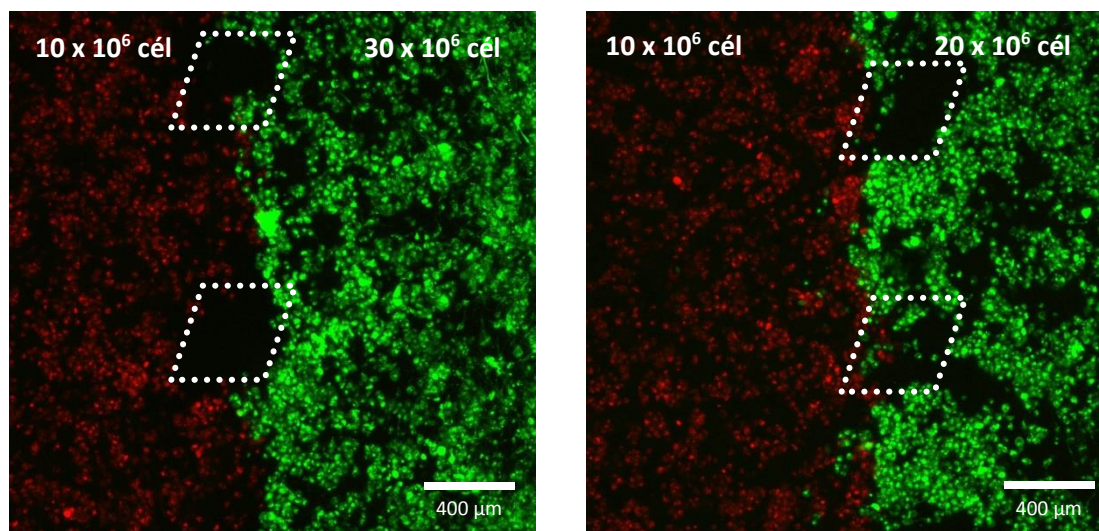
**Figura 8:** Histograma de intensidad fluorescente roja y verde.

Tinción de viabilidad calceína/PI. Se observa cómo con el paso de los días en el centro del microdispositivo la necrosis celular aumenta, alcanzando su pico a los 3 días de incubación.

#### 4.3. CO-CULTIVO EN CHIP:

El protocolo de confinamiento se ha empleado para generar co-cultivos organizados y funciona correctamente. Como prueba de concepto se hicieron 2 cultivos yuxtapuestos de U251-MG marcadas en diferentes colores a distintas densidades. Sin embargo, no se observó migración alguna entre ellos (fig 9).

FIGURA 9: CO-CULTIVO EN CHIP



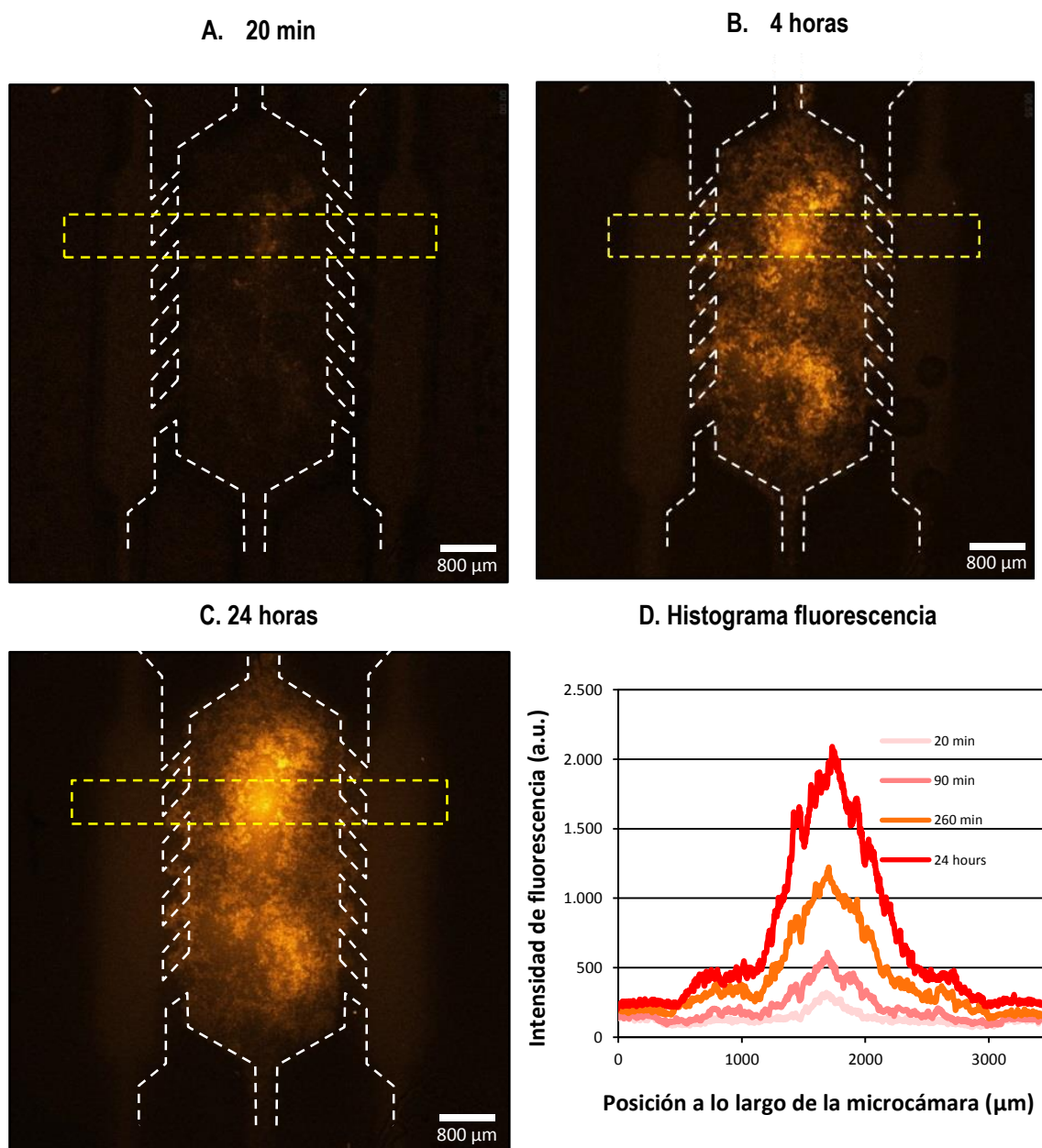
**Figura 9:** Fotos tomadas al microscopio confocal de una sección del chip donde se observan los cultivos yuxtapuestos tras 3 días de incubación, aumento 10x. Como se observa en las imágenes, el confinamiento se ha realizado correctamente, poniendo en contacto ambos cultivos. Sin embargo, no se observa migración de uno a otro.

#### 4.4. TINCIÓN DE HIPOXIA:

El reactivo de hipoxia funciona correctamente en las células U251-MG dentro del microdispositivo y nos permite estudiar de forma eficaz cómo evoluciona el perfil de hipoxia con el tiempo. Conforme avanzan los minutos, se observa cómo en el centro del chip aparece un núcleo fluorescente que va ganando intensidad, lo que indica la presencia de condiciones hipóxicas. A medida que nos acercamos hacia los canales laterales, esta fluorescencia es menor, sugiriendo así que aquí la hipoxia es menos intensa (fig 10:A, B y C).

Se obtuvo el histograma de intensidad de fluorescencia para la sección delimitada (rectángulo amarillo) en el chip (fig 10: C) haciendo uso de las fotos tomadas con el microscopio y el software *Fiji*®. Como se observa en el histograma, es el centro del chip el que presenta una mayor intensidad fluorescente para los 4 tiempos representados. A ambos lados de este gran pico fluorescente la intensidad va disminuyendo a medida que nos acercamos a los canales laterales. Como se puede ver en las fotos de la figura 10 (A, B y C), la dispersión de células en la cámara del chip era irregular, encontramos “huecos vacíos” sin apenas células. Cabe destacar que en estos huecos sin células la intensidad de la señal de hipoxia es menor, justo como cabría esperar de una región donde no hay células que puedan seguir consumiendo el oxígeno.



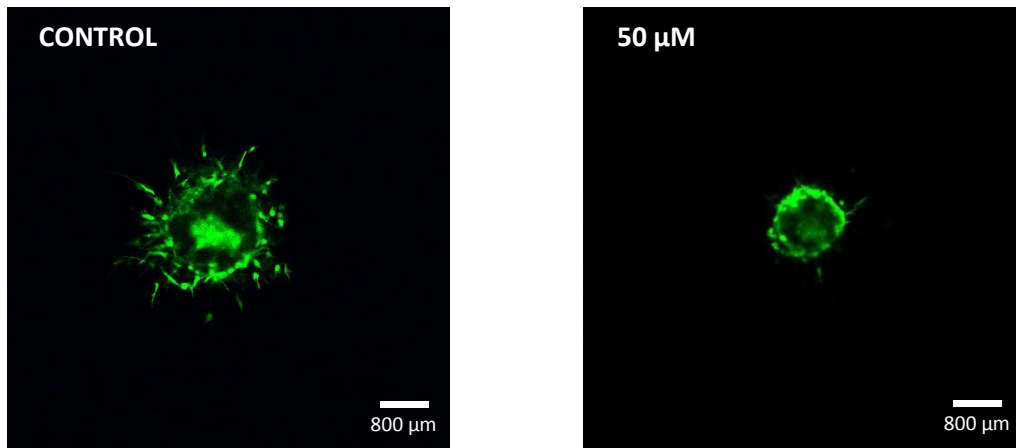


**Figura 10:** A, B y C. Fotos del microdispositivo con un 40 millones cels/ml tomadas al microscopio a 20 minutos, 4 y 24 horas. Aumento 2x, tinción de hipoxia 10  $\mu\text{M}$ . D. Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia a lo largo de la microcámara para el área contenida en la sección rectangular amarilla.

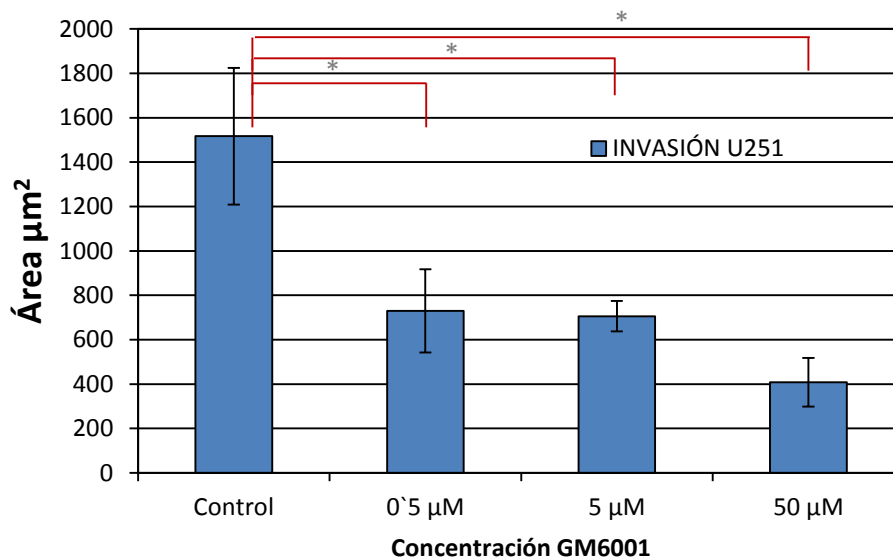
#### 4.5. ENSAYO DEL FÁRMACO GM6001:

Se llevaron a cabo ensayos de invasión empleando esferoides de U-251-MG para testar el efecto del compuesto GM6001, un inhibidor de la metaloproteasas de membrana. Se observó que el GM6001 presenta un efecto inhibitor sobre la migración celular en glioblastoma. Como se puede observar en las figuras 11 y 12, pasados 3 días desde la adición del fármaco el área de los esferoides mostró una disminución con respecto a los controles.

El efecto antimigratorio es más acusado para la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , donde se ve claramente cómo los esferoides apenas presentan prolongaciones celulares a lo largo de su superficie. Las concentraciones 0,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  también tuvieron un efecto antimigratorio acusado con respecto al control pero entre ambas concentraciones la diferencia no era significativa.

**FIGURA 11: EFECTO ANTIMIGRATORIO SOBRE ESFEROIDES U251**

**Figura 11:** Imágenes obtenidas con el microscopio confocal donde se muestran las condiciones control y 50  $\mu\text{M}$  del fármaco GM6001. Aumento 2x, U-251-MG-GFP.

**FIGURA X: INVASIÓN U251**

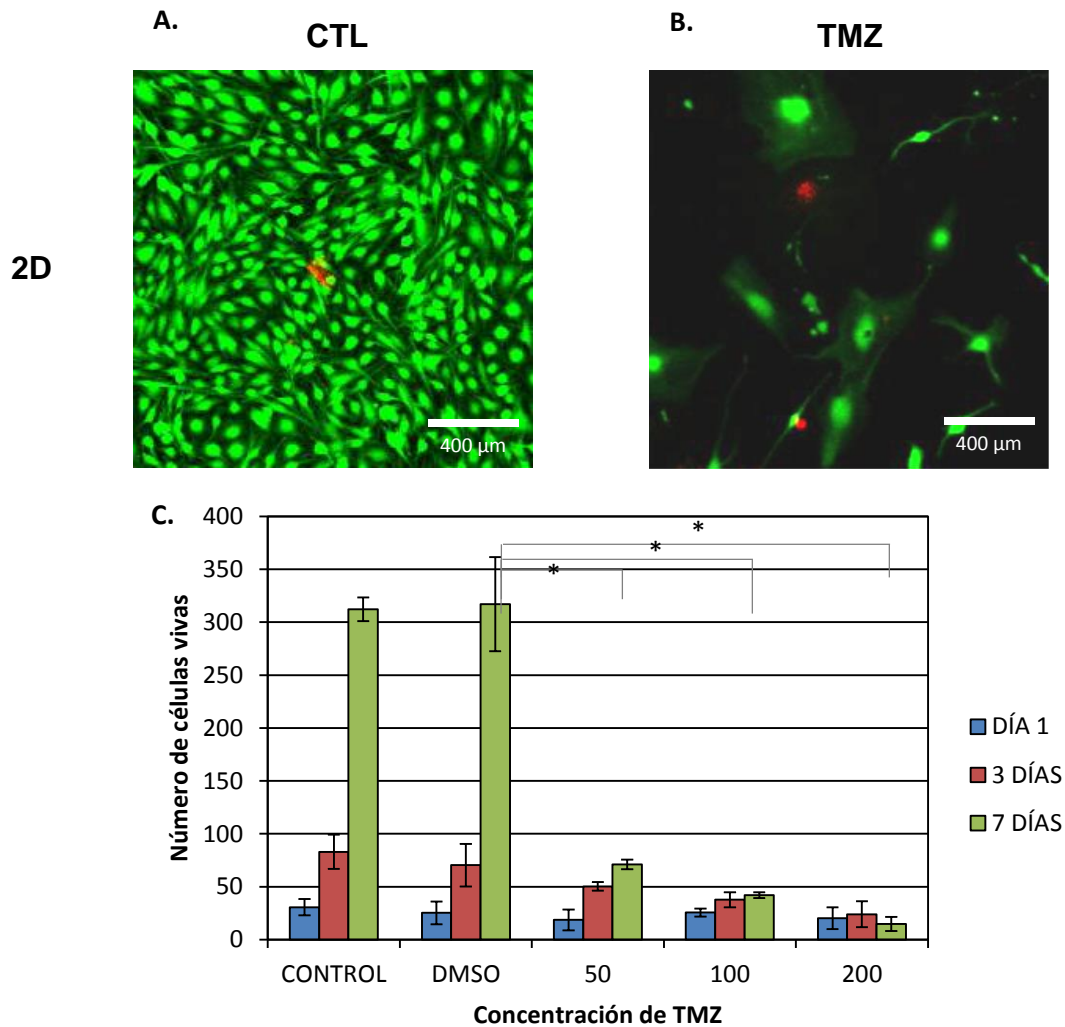
**Figura 12:** Gráfica que representa el efecto del fármaco GM6001 sobre el área de los esferoides de U251. La medida del área se realizó con el programa de análisis de imagen Fiji®.

#### 4.6. ENSAYO DE TOXIDIDAD DE LA TEMOZOLODAMIDA (TMZ):

Durante el presente trabajo, se demostró que en cultivos 2D la TMZ ejerce un potente efecto tóxico sobre las células de GBM cultivadas en 2D.

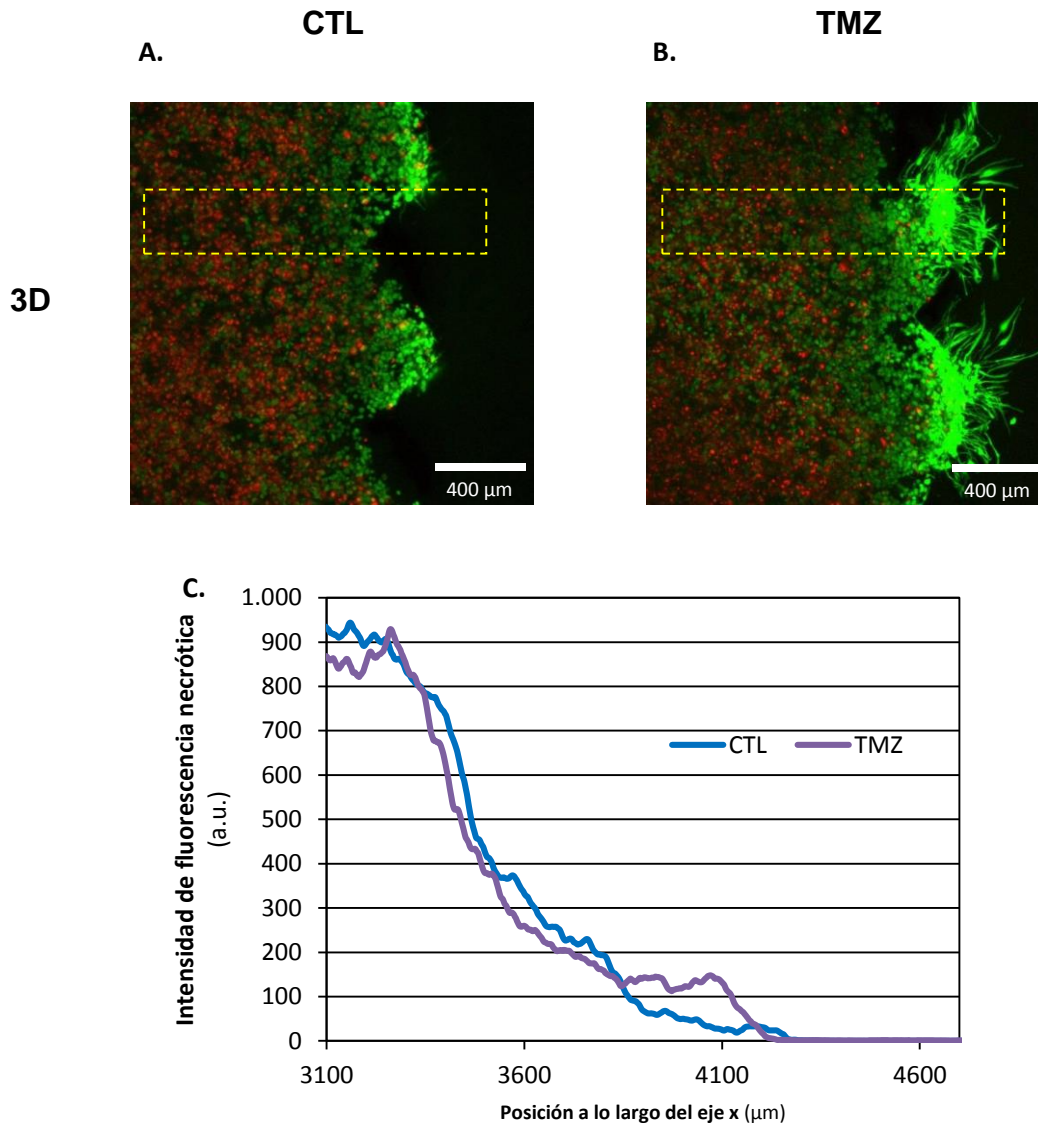
En la siguiente figura (fig 13) se observa cómo en placas de Petri la TMZ disminuye de forma drástica la viabilidad celular a cualquiera de las distintas concentraciones empleadas, además de inducir un aumento en el tamaño de las células (discutido más adelante). Así mismo, el DMSO demostró no tener efecto tóxico sobre las células.





**Figura 13:** **A y B.** Fotos tomadas de los pocillos control y 200 $\mu$ M a los 7 días de exposición; aumento de 10x, tinción calceína/PI. **C.** La viabilidad celular se obtuvo realizando un conteo celular para una misma sección en cada pocillo.

Sin embargo, en el interior de los chips no se aprecia un efecto tóxico tan intenso como en las placas de Petri (fig 14: A y B). Las células tratadas con TMZ en los chips presentan una viabilidad muy similar a la obtenida en las células control (fig 14: C). Estos resultados están en perfecta concordancia con previos ensayos que mostraban cómo células U251-MG no se veían afectadas por la TMZ cuando eran cultivadas en un ambiente 3D.

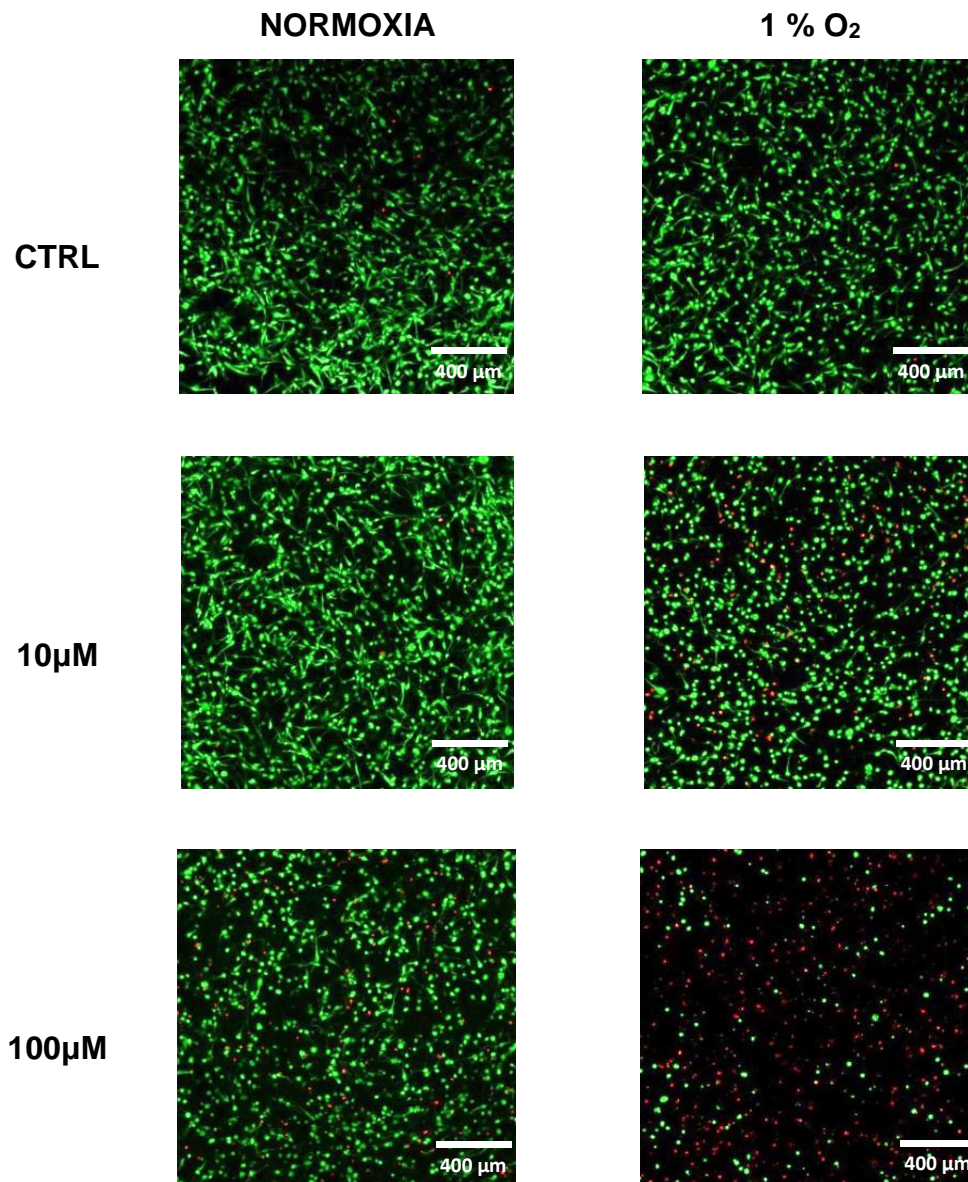


**Figura 14: A y B.** Fotos del chip control y 200  $\mu\text{M}$  a los 3 días de exposición; aumento 10x, tinción calceína/PI. **C.** Gráfica donde se comparan las viabilidades de los cultivos control y con TMZ a lo largo del chip. Se obtuvo el histograma de intensidad roja para el área contenida en la sección rectangular amarilla.

#### 4.7. ENSAYO DEL FÁRMACO TIRAPAZAMINA (TPZ):

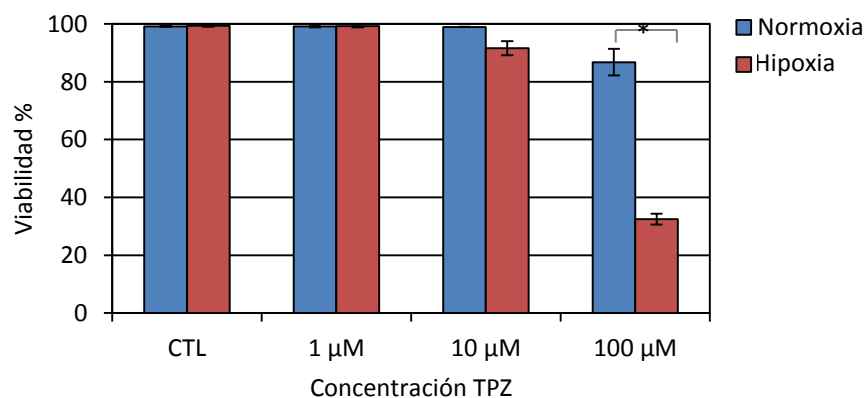
Tanto dentro como fuera del microdispositivo, la TPZ presentó un efecto citotóxico sobre las células que se encontraban en situación de hipoxia. Una vez activada, el mecanismo de actuación de la Tirapazamina consiste en generar rupturas de doble hebra en el DNA. Sin embargo la activación de la TPZ tan sólo se produce en niveles muy bajos de oxígeno, tales como los que aparecen en los tumores sólidos humanos (hipoxia tumoral).

En los ensayos en placas de Petri se observó un efecto citotóxico mayor en condiciones de hipoxia comparado con el producido en normoxia (fig 15), siendo este último únicamente observable significativamente para la concentración más elevada del fármaco (100 $\mu\text{M}$ ). La distribución de células vivas y muertas es homogénea en toda la placa y a medida que aumenta la concentración de TPZ, la viabilidad celular disminuye.



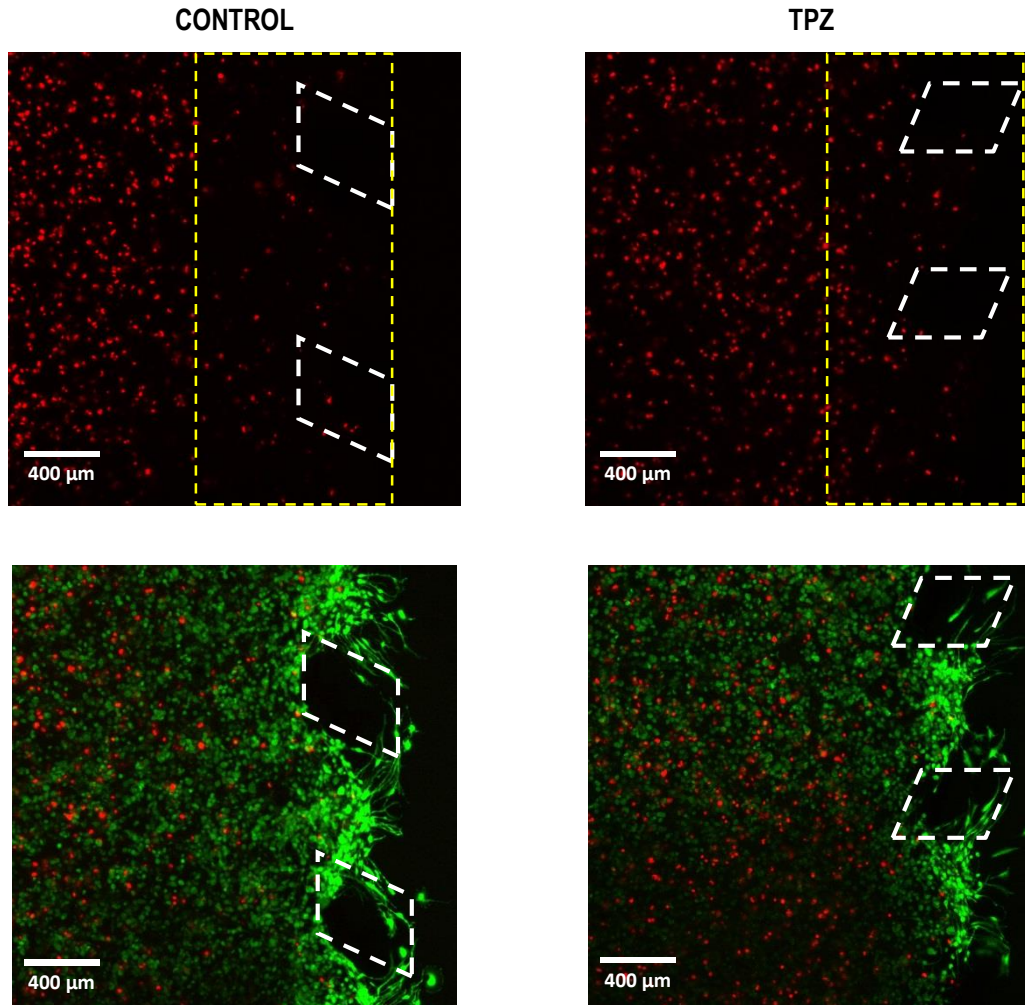
**Figura 15:** imágenes de viabilidad tomadas al microscopio de confocal con un aumento de 10X.

Con los datos obtenidos para las placas de Petri se calculó la viabilidad celular para cada concentración de TPZ y oxígeno. Como podemos ver en la figura 16, la viabilidad disminuye de forma drástica cuando el fármaco se utiliza a 100µM en condiciones de hipoxia.



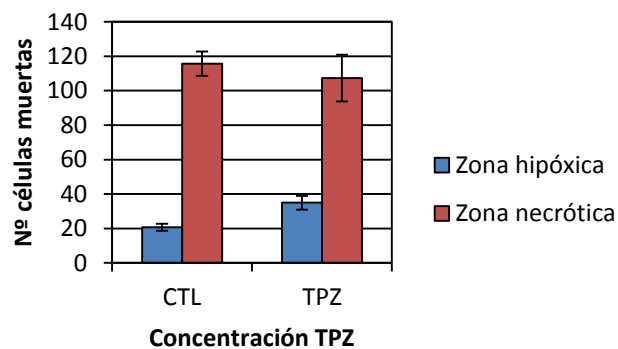
**Figura 16:** Efecto de la TPZ sobre la viabilidad celular en placas de Petri. La viabilidad se obtuvo mediante un conteo celular para una misma sección, utilizando la tinción de viabilidad.

En el interior de los microdispositivos se observan dos zonas claramente diferenciadas: una zona necrótica, una zona hipóxica donde la TPZ presenta efecto citotóxico y una zona normóxica adyacente a los canales laterales, donde la TPZ apenas presenta efecto citotóxico (fig 17 y 18).



**Figura 17:** imágenes tomadas al microscopio confocal de la cámara central de los chips. Aumento 10x, tinción de viabilidad (calceína/PI).

Como se observa en las figuras 16 y 17, el efecto de la TPZ es más acusado en las placas de Petri, lo cual se debe a la hipoxia general que inducimos sobre las mismas. Sin embargo en el microdispositivo podemos recrear mejor el microentorno tumoral, distinguiendo las zonas normóxica e hipóxica y observar de qué forma les afecta el fármaco TPZ.



**Figura 18:** Efecto de TPZ sobre la viabilidad celular en los microdispositivos. La viabilidad se obtuvo mediante un conteo celular para una misma sección, utilizando la tinción de viabilidad.



## 5. DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se ha presentado un microdispositivo diseñado y fabricado por el grupo GEMM que ha demostrado adaptarse perfectamente a los objetivos perseguidos por el proyecto. Además de ser biocompatible, su versatilidad ha permitido la realización de diferentes ensayos que abren nuevas posibilidades para futuras investigaciones.

Con el cultivo a altas densidades, hemos conseguido recrear la zona necrótica característica del GBM así como la zona hipóxica adyacente. A la vista de los resultados, se hace evidente que es necesaria una situación de estrés o "incomodidad" para que las células desarrollen este núcleo necrótico, ya que a densidades bajas no se observó dicha necrosis. Este nuevo tipo de ensayo desarrollado durante este proyecto permitirá testar la hipótesis del vaso trombosado como elemento desencadenante de la invasión, debido a un gradiente de nutrientes y oxígeno incapaz de abastecer la demanda metabólica del tumor<sup>4</sup>.

El protocolo desarrollado para la realización de co-cultivos nos acerca un poco más a la estructura compleja que compone el microentorno tumoral. En el presente proyecto, los co-cultivos estaban formados por células tumorales. Sin embargo, ensayos futuros podrían incluir la realización de co-cultivos con células tumorales y astrocitos sanos, simulando la invasión del tumor sobre el tejido sano. Como hemos comentado anteriormente en el apartado de resultados, no se observó migración entre cultivos. Una posible causa puede residir en las densidades celulares ensayadas en el co-cultivo; es posible que las células tumorales no hubiesen alcanzado esa situación crítica que indujese su migración hacia el cultivo con nutrientes. Otra posible explicación podría ser que durante el confinamiento, se podría no haber llegado a un contacto directo entre ambos geles, dejando algún espacio que impediría la migración celular. También es posible que la transición entre geles, aún en contacto, suponga en realidad un obstáculo para las células y no sea tan fácil como pensamos debido a ligeras diferencias entre concentraciones o gradientes. Una de las hipótesis más probables es que sean los astrocitos sanos los que produzcan factores que provoquen la migración de las células tumorales hipóxicas. Sin embargo en este ensayo se han co-cultivado dos poblaciones de la misma línea celular de GBM, por lo que no necesariamente debería haber un proceso de quimotaxis<sup>20</sup>. Futuros ensayos empleando astrocitos sanos junto a células tumorales podrían arrojar un poco más de luz a esta cuestión.

La tinción de hipoxia permite observar el gradiente de oxígeno como proceso característico en el desarrollo del GBM. Como hemos comentado anteriormente, a medida que nos acercamos hacia los canales laterales, la fluorescencia observada es menor, sugiriendo una hipoxia menos intensa. Este comportamiento parece razonable dado que en el centro del chip las células están más alejadas de la fuente de nutrientes y desarrollan una zona hipóxica propia de un núcleo necrótico. Sin embargo, las células más cercanas a los canales laterales tienen mayor disponibilidad de nutrientes por lo que permanecen durante más tiempo en situación de normoxia. Estos resultados estarían en concordancia con previos estudios, donde se defiende el sometimiento de las células tumorales a una hipoxia localizada a la que se cree que se adaptan y responden aumentando su capacidad de migración<sup>4</sup>.

Por otro lado, la TMZ ejerce un potente efecto citotóxico sobre el GBM en 2D, pero no ocurre lo mismo en un entorno 3D. Debido a su mecanismo de acción, la TMZ se dirige contra las células que están en división. Recordemos que según la hipótesis del GBM, este tumor se caracteriza por unas células muy invasivas pero no tan proliferativas<sup>4</sup>. Esto explicaría por tanto la poca efectividad de la TMZ en un entorno 3D bajo en nutrientes; las células migran en busca de estos nutrientes y sólo aquellas que proliferan son susceptibles a la TMZ. Sumado a esto, en el interior de los microdispositivos las células no presentan un metabolismo tan acelerado como en las placas de Petri, por lo que invierten un mayor tiempo en adaptarse al entorno y pueden desarrollar resistencia a la TMZ. Es por ello por lo que numerosos estudios han dirigido sus esfuerzos a disminuir esta resistencia, ya sea combinando la TMZ con otros fármacos o modificando su mecanismo de actuación<sup>21</sup>. Por otra parte, este ensayo demuestra la información tan útil que nos proporciona trabajar con este modelo. De esta forma, un fármaco que parecía prometedor en 2D

resulta ser ineficaz en un entorno más cercano al fisiológico. El aumento del tamaño celular observado con la TMZ puede deberse a varios factores. En primer lugar, cuando las células se encuentran en confluencia tienden a apretarse más las unas con las otras, mostrando un aparente menor tamaño. Por otro lado, con la TMZ se introducen una gran cantidad de alteraciones genéticas que afectan a la morfología celular pudiendo resultar en un aumento de tamaño.

La TPZ ha resultado ser eficiente sobre células tumorales hipóxicas. Estas regiones hipóxicas tumorales presentan una mayor resistencia a los fármacos convencionales<sup>21</sup>, por lo que su combinación con la TPZ puede resultar en un tratamiento muy efectivo.

El compuesto GM6001 ha demostrado frenar la expansión tumoral sobre esferoides de GBM. Nuevos ensayos podrían ir dirigidos hacia la evaluación del fármaco sobre células en dispersión en el interior de los microdispositivos. Además, diversos estudios han confirmado su efecto inhibitor sobre la invasión mediada por metaloproteasas celulares, destacando su posible aplicación en el tratamiento de enfermedades<sup>22-23</sup>.

Dado que el GBM es un tumor cerebral, cabe destacar que cualquier fármaco que vaya dirigido al mismo debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Esto es un factor muy a tener en cuenta en la búsqueda de fármacos más efectivos y su mimetización basada en el microdispositivo puede ser objeto de futuros ensayos.

Tras el estudio realizado en el presente proyecto, la combinación de fármacos que actúen contra células en proliferación junto a otros fármacos tales como la TPZ y GM6001 puede resultar en terapias muy efectivas. Estaríamos atacando así a células en división y quiescentes a la vez que frenamos la migración celular característica del GBM.

## 6. CONCLUSIONES:

Durante el presente proyecto se han llevado a cabo con éxito algunos de los ensayos y técnicas necesarias para el desarrollo del modelo *in vitro* del GBM. Con el trabajo aquí recogido, se asientan unas bases sobre las cuales se abre un nuevo y amplio abanico de posibilidades para el cultivo celular. Sumado a esto, la evaluación de los distintos fármacos ha proporcionado información muy valiosa sobre el funcionamiento del tumor, el microdispositivo y el modelo en conjunto. De este proyecto podemos sacar las siguientes conclusiones:

1. Los microdispositivos han demostrado ser una herramienta muy útil para el estudio del GBM, acercándonos más a la recreación del microentorno asociado al tumor.
2. El cultivo a alta densidad en el microdispositivo permite mimetizar la necrosis centralizada característica del GBM y su hipoxia asociada, ésta última siendo perfectamente observable mediante la tinción desarrollada.
3. Se ha logrado desarrollar un protocolo eficiente para co-cultivo en los microdispositivos, dando pie a futuros ensayos que podrían representar mejor la interacción entre el tumor y el tejido sano.
4. El compuesto GM6001 tiene efecto antimigratorio sobre esferoides de GBM.
5. La TMZ presenta efecto citotóxico en 2D pero este apenas es perceptible en un entorno 3D. Estos resultados apoyan la concepción del GBM como astrocitoma más invasivo que proliferativo.
6. La TPZ tiene efecto tóxico dentro del microdispositivo en condiciones de hipoxia, proporcionando unos resultados prometedores que animan a la valoración de este fármaco como posible tratamiento en combinación con otros.

Todavía queda mucho camino por recorrer tanto en la tecnología de la microfluídica como en el conocimiento del GBM, pero con el presente proyecto se pretende dar un paso más y continuar avanzando en el desarrollo de técnicas prometedoras que permitan hacer frente a una de las principales causas de muerte en el mundo.

## 6. CONCLUSIONS:

*During the present project some of the trials and techniques required for the development of the GBM in vitro model have been done. With the work covered here, we open a new and wide variety of possibilities for the cell culture. In addition to this, the drug testing has provided valuable information about the tumor, the microdevice and the model as a whole. For this project we can extract the following conclusions:*

1. *Microdevices have shown to be an useful tool for the GBM study, getting us closer to the associated tumor microenvironment recreation.*
2. *High density culture in the microdevices allows us to imitate the characteristic GBM's centralised necrosis and the adjacent hypoxia, which can be perfectly observed by the developed hypoxic stain.*
3. *An efficient co-culture protocol inside the microdevices has been developed, giving the chance to do future trials that could represent the interaction between the tumor and healthy tissue in a better way.*
4. *GM6001 has an antimigratory effect over the GBM's spheroids.*
5. *TMZ presents a cytotoxic effect in 2D but this effect is barely noticeable in a 3D environment. These results support the idea of the GBM as a more invasive than proliferative tumor.*
6. *TPZ has a toxic effect inside the microdevice in hypoxic conditions, providing promising results that encourage the valuation of this drug as a possible treatment combined with others.*

*There is still a long journey to cross over in the microfluidic technology and in the GBM knowledge, but with the present project we try to step forward and continue advancing with the development of promising techniques which could face one of the main causes of death in the world.*



## 7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Dolecek, Therese A., et al. "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009." *Neuro-oncology* 14.suppl 5 (2012): v1-v49.
2. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, et al. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds). *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*, 2<sup>nd</sup> edn. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2000, pp 29–39.
3. Swanson KR, Bridge C, Murray JD, et al. Virtual and real brain tumors: using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion. *J Neurol Sci* 2003;216:1–10.
4. Brat, Daniel J., and Erwin G. Van Meir. "Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma." *Laboratory investigation* 84.4 (2004): 397-405.
5. Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, et al. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett* 1995;195:81–84.
6. Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53: 606–616.
7. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, et al. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988;62:2152–2165.
8. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987;59:1617–1625.
9. Curran Jr WJ, Scott CB, Horton J, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation therapy oncology group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:704–710.
10. Brat DJ, Castellano-Sanchez A, Hunter SB, et al. Pseudopalisading cells in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by a rapidly migrating population. *Cancer Res* 2004;64:910–919.
11. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000;88:2606–2618.
12. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63: 1138–1143.
13. Mori T, Abe T, Wakabayashi Y, et al. Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor correlates with enhanced invasion activity of human glioma cells mediated by transforming growth factoralpha or basic fibroblast growth factor. *J Neurooncol* 2000;46:115–123.
14. Brat, Daniel J., et al. "Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population." *Cancer research* 64.3 (2004): 920-927.
15. Sackmann, Eric K., Anna L. Fulton, and David J. Beebe. "The present and future role of microfluidics in biomedical research." *Nature* 507.7491 (2014): 181-189.

16. Regehr, K. J. et al. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab Chip* 9, 2132–2139 (2009). A study that details the biological implications of using PDMS in cell biology research.
17. Toepke, M. W. & Beebe, D. J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip* 6, 1484–1486 (2006).
18. Berthier, E., Young, E. W. K. & Beebe, D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip* 12, 1224–1237 (2012).
19. Li, Hongyang, et al. "Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells." *Tissue and Cell* 47.1 (2015): 39-48.
20. Rath, Barbara H., et al. "Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells." *PloS one* 8.1 (2013): e54752.
21. Messaoudi, Khaled, Anne Clavreul, and Frédéric Lagarce. "Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide." *Drug discovery today* (2015).
22. Noma, Naruto, et al. "Inhibition of MMP-2-Mediated Mast Cell Invasion by NF- $\kappa$ B Inhibitor DHMEQ in Mast Cells." *International archives of allergy and immunology* 166.2 (2015): 84-90.
23. Kis-Toth, Katalin, et al. "Monocyte-derived dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by GM6001." *Immunobiology* 218.11 (2013): 1361-1369.

## ANEXO 1: PROTOCOLOS DETALLADOS

### 3.2. CULTIVO RUTINARIO:

1. Retirar medio de cultivo.
2. Lavar con PBS (Lonza 17-516F), se usa el mismo volumen que de medio.
3. Añadir un volumen de tripsina (Lonza BE17-160E) equivalente al 20% del volumen de medio de cultivo y dejar el cultivo dentro del incubador durante 5'.
4. Inactivar la tripsina añadiendo medio de cultivo DG-10.
5. Centrifugar las células durante 5' a 450g.
6. Retirar el sobrenadante.
7. Resuspender en el volumen de medio adecuado para conseguir la concentración de células deseada.
8. Sembrar las células en un nuevo frasco o utilizarlas en suspensión si así se desea.

### 3.3. FORMACIÓN DE ESFEROIDES:

1. Preparación de Methocel: disolver 12 g de metilcelulosa autoclavada (Sigma, M0512) en un litro de medio DG-10 y centrifugar la dilución resultante durante 2'5 horas a 4000g. Conservar el sobrenadante.
2. Mezclar medio DG-10, Methocel y suspensión celular obtenida por el protocolo anterior (3.2) a la concentración deseada en las proporciones 79 %, 20% y 1% respectivamente.
3. Formar gotas de 25 µl en la superficie de la tapa de una placa de Petri.
4. Incubar las gotas 24h a 37°, 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.4. PREPARACIÓN DEL CULTIVO 3D:

1. Introducir 50 µl de colágeno stock (3mg/ml) en un Eppendorf.
2. Añadir 2'4 µl de NaOH (1N, Sigma 655104).
3. Añadir 13'1 µl de medio DMEM 5x.
4. Añadir 34'5 µl de la suspensión de esferoides preparados en la sección 3.3 o suspensión de células preparada en la sección 3.2 a la densidad deseada.

Todos los reactivos utilizados se mantuvieron en hielo durante la preparación del hidrogel para evitar su polimerización temprana.

### 3.5. CULTIVO A DISTINTAS DENSIDADES EN CHIP

1. Esterilizar los chips perfundiendo con Etanol 70% los canales laterales y la cámara central.
2. Retirar el etanol y secar el chip completamente.
3. Perfusión de la cámara central del chip con 10 µl de hidrogel preparado según el apartado 3.4 a la concentración de células deseada. En concreto se emplearon la siguientes densidades:
4. 40 millones cels/ml.
5. 20 millones cels/ml.
6. 4 millones cels/ml.
7. Dejar polimerizar durante 15' en el incubador, (37°, 5 % CO<sub>2</sub>).
8. Perfundir los canales laterales con medio de cultivo
9. Cubrir la placa que contiene al chip con medio de cultivo.

### 3.6. CO-CULTIVO EN CHIP:

1. Subcultivar las células siguiendo el protocolo detallado en 3.2 hasta el paso de tripsinización de las células. Con las células todavía suspendidas en medio de cultivo y tripsina, se aplica la tinción de la siguiente forma:
  - a) Este volumen se divide en dos, para poder realizar la tinción de células en verde y células en rojo en tubos distintos.
  - b) Para cada tubo, se añaden 5  $\mu$ l de tinción por cada mililitro de cultivo, considerando que la concentración del cultivo es de 1 millón de células/ml. Teñir durante 5'.
  - c) Pasado ese tiempo, centrifugar las células durante 5', 450 g.
  - d) Retirar el medio con Vybrant® y resuspender en un volumen cualquiera y volver a centrifugar.
  - e) Resuspender el pellet de ambos tubos en el volumen necesario de medio para conseguir la concentración final de células deseada.
2. Preparar 100  $\mu$ l del hidrogel correspondiente siguiendo el protocolo del apartado 3.4.
3. Perfundir 10  $\mu$ l del gel preparado por la cámara central del chip y dejar polimerizar 15'.
4. Preparar los hidrogeles de los canales laterales, empleando el protocolo anterior pero utilizando ahora la dilución de células correspondiente marcada en verde.
5. Perfundir por el canal lateral 10  $\mu$ l del hidrogel correspondiente y dejar polimerizar 15'. Hacer esto para las dos densidades distintas.
6. Perfundir por el canal lateral restante del chip 20  $\mu$ l medio de cultivo.
7. Cubrir con medio de cultivo las placas de cultivo que contienen a los chips para disminuir la evaporación e incubar a 37°, 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Observar al microscopio para los días 0, 1 y 2.

### 3.7. TINCIÓN DE HIPOXIA:

1. Preparar el stock de tinción disolviendo 1 mg del compuesto en 1'4 ml de DMSO, quedando una concentración final de 1 mM.
2. Cultivar las células en el interior del chip siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.5 pero suplementando el gel con una concentración de tinción de 10  $\mu$ M.
3. Tras dejar polimerizar el gel 15', perfundir los canales laterales con medio de cultivo DG10 con una concentración de tinción de 10  $\mu$ M.
4. Nada más perfundir los canales laterales, tomar fotos al microscopio confocal cada 10' durante 4 horas.
5. Tomar una última foto a las 24 horas.

### 3.8. ENSAYO DEL FÁRMACO GM6001

1. Preparar para cada condición 100  $\mu$ l de gel con al menos 1 esferoide en su interior, siguiendo el protocolo del apartado 3.4. Mantener en hielo.
2. Preparar el stock de GM6001 a 50 mM disolviendo 5 mg del compuesto en 0'2574 ml de DMSO.
3. Preparar a partir de este stock las diluciones de GM6001 a 50, 500 y 5000  $\mu$ M.
4. Añadir 1  $\mu$ l de la dilución de GM6001 correspondiente a los 100  $\mu$ l de gel de cada condición (todavía sin polimerizar) salvo para el gel control, al que no se le añadió GM6001.
5. Depositar cada gel en los pocillos de una placa de 96 y dejar polimerizar durante 15' en el incubador.
6. Tras la polimerización del gel, cubrir los pocillos con medio DG10 a la concentración de GM6001 adecuada e incubar a 37 ° 5% de CO<sub>2</sub>.
7. Tomar fotos de los resultados al microscopio a los 3 días.

**3.9. ENSAYO DE TOXIDIDAD DE LA TEMOZOLODAMIDA (TMZ):**

1. Tras realizar el subcultivo explicado en el apartado 3.2, se siembran 100  $\mu$ l de suspensión celular (1000 células en total) en placas de 96 pocillos. Se dejan incubando las placas durante 24h, a 37° y 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Preparación de la dilución stock de TMZ a 100 mM disolviendo 25 mg en 1'28 ml de DMSO.
3. Mediante diluciones seriadas a partir del stock y utilizando como diluyente medio DG10, se obtienen las diluciones de trabajo de 200, 100 y 50  $\mu$ M de TMZ.
4. Se retira el medio de cultivo de los pocillos con las células.
5. Se añaden 100  $\mu$ l de la dilución correspondiente de TMZ.
6. Durante los días 1,3 y 7 tras la adición del fármaco se visualizan los resultados al microscopio de fluorescencia.

Para el ensayo en el interior de los microdispositivos, se siguió el siguiente protocolo:

1. Preparar 100  $\mu$ l de gel con 40 millones de células/ml, siguiendo los protocolos detallados en los apartados 3.4 y 3.5 y añadir la concentración de TMZ correspondiente.
2. Tras la polimerización del gel, cubrir con medio DG10 y llevar al incubador.
3. Incubar durante 3 días y medir la viabilidad con la tinción de calceína y yoduro de propidio.

**3.10. ENSAYO DEL FÁRMACO TIRAPAZAMINA (TPZ):**

1. Preparar el stock de TPZ a 50 mM disolviendo 8'9 mg del compuesto en 1 ml de DMSO.
2. Preparar las diluciones de trabajo de 1, 10 y 100  $\mu$ M de TPZ a partir del stock.
3. Preparar 100  $\mu$ l de gel con 1 millón de células/ml para las placas de Petri y con 40 millones de células/ml para el chip, siguiendo los protocolos detallados en los apartados 3.4 y 3.5 y añadir la concentración de TPZ correspondiente.
4. Tras la polimerización del gel, tanto en las placas como en el chip, cubrir con medio DG10 y llevar al incubador adecuado:
  - a) Placas de Petri:
    - Condición de hipoxia: incubador con 1% de oxígeno
    - Condición de normoxia: incubador con 20 % de oxígeno
  - b) Chips: se llevan al incubador de normoxia, ya que en el propio microentorno celular se producen zonas hipóxicas y normóxicas.
5. Incubar durante 3 días y medir la viabilidad con la tinción de calceína y yoduro de propidio.

**3.11. TINCIÓN DE VIABILIDAD:**

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Diluir 1:1000 el stock de calceína (1 mg/ml) en medio de cultivo.
3. Añadir dilución 1:500 el stock de PI (2 mg/ml) en medio de cultivo
4. Observar al microscopio.